

172. 骨肉腫の転移巣形成機序の解明と治療標的の探索

三輪 真嗣

*金沢大学 大学院医薬保健学総合研究科 先進運動器医療創成講座

Key words : 骨肉腫, 新規治療, GSK-3 β

緒言

骨肉腫は10~20代に好発する悪性骨腫瘍であり、その発生頻度は1~2人/100万人といわれている。化学療法の導入前は患肢切断術が基本であったが長期生存は10%程度であった。化学療法の導入により長期生存率が著しく改善され、近年では肺転移のない症例における5年生存率は60~70%と報告されている。一方、初診時に肺転移を有する症例では5年生存率は15~35%と報告されており、肺転移症例では依然として予後不良である。したがって、骨肉腫の治療において全身治療による肺転移の制御が非常に重要といえる。しかし、化学療法に用いる抗腫瘍薬はメソトレキセート、シスプラチン、ドキソルビシン、イフォスファミドを中心としたものから発展がなく新しい薬剤の開発が望まれる。

分子標的治療は、がん増殖や生存に起因する特定の分子を標的とする治療薬で、正常組織へ与える影響も少なく近年注目を浴びている。他のがん種では分子標的治療が確立されてきており、治療薬の臨床での有用性も確認されている。近年、軟部肉腫に対する分子標的治療が開発され、臨床で用いることができるようになってきたが、骨肉腫に対する分子標的治療の研究はまだ十分ではなく、臨床で使用できる分子標的薬はない。

Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β)は糖代謝や細胞分化などの機能を制御する分子であるが、大腸癌など、多くのがん種で細胞増殖に関与することが明らかにされている。本研究の目的は、骨肉腫におけるGSK-3 β 阻害薬の有効性、有用性を検討することである。

方法

1. *In vitro* 実験

1) 骨肉腫細胞におけるGSK-3 β の発現

ヒト骨肉腫細胞株HOS、MG63、143-B、Saos-2、ヒト骨芽細胞株hFOB 1.19における活性型GSK-3 β の発現をWestern blottingで評価した。

2) 骨肉腫細胞に対するGSK-3 β 阻害薬の効果

ヒト骨肉腫細胞株、ヒト骨芽細胞株hFOB 1.19をGSK-3 β 阻害薬(AR-A014418, SB-216763)で処理し、WST-8 assay、BrdU ELISA、TUNEL imaging assayで評価した。

次に、siRNAにより骨肉腫細胞におけるGSK-3 β を特異的に阻害し、細胞増殖とアポトーシス誘導をWST-8 assay、TUNEL imaging assayにより評価した。また、GSK-3 β 阻害薬による骨代謝への影響を評価するため、GSK-3 β 阻害薬投与後の β -catenin発現をWestern blotting analysis、TOP/FOP flash、Immunofluorescent stainingにより評価した。

2. *In vivo* 実験

ヌードマウスの脛骨にヒト骨肉腫細胞株143-B細胞を移植することにより骨肉腫モデルを作製した。GSK-3 β 阻害薬(AR-A014418, SB-216763)2 mg/kgの腹腔内注射を週3回、5週間行い、コントロール群のマウスにはDMSOを

腹腔内注射した。腫瘍体積は $0.5 \times (\text{短径})^2 \times (\text{長径})$ で算出し、継時的な体積の変化を評価した。また、8週の時点でマウスを屠殺して腫瘍を切除し、重量を測定し、切除した腫瘍組織については病理学的に評価した。

結果

1. *In vitro* 実験

1) 骨肉腫細胞における GSK-3 β の発現

骨肉腫細胞と骨芽細胞における GSK-3 β の発現を比較したところ、骨肉腫細胞では活性化型である pGSK3 β Tyr216 の高い発現を示した。一方、骨芽細胞では不活性化型である pGSK3 β Ser9 の高い発現を示した。

2) 骨肉腫細胞に対する GSK-3 β 阻害薬の効果

骨肉腫細胞を GSK-3 β 阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) で刺激したところ、GSK-3 β 阻害薬は用量依存的、時間依存的に腫瘍細胞の viability を低下させた。

AR-A014418と細胞増殖

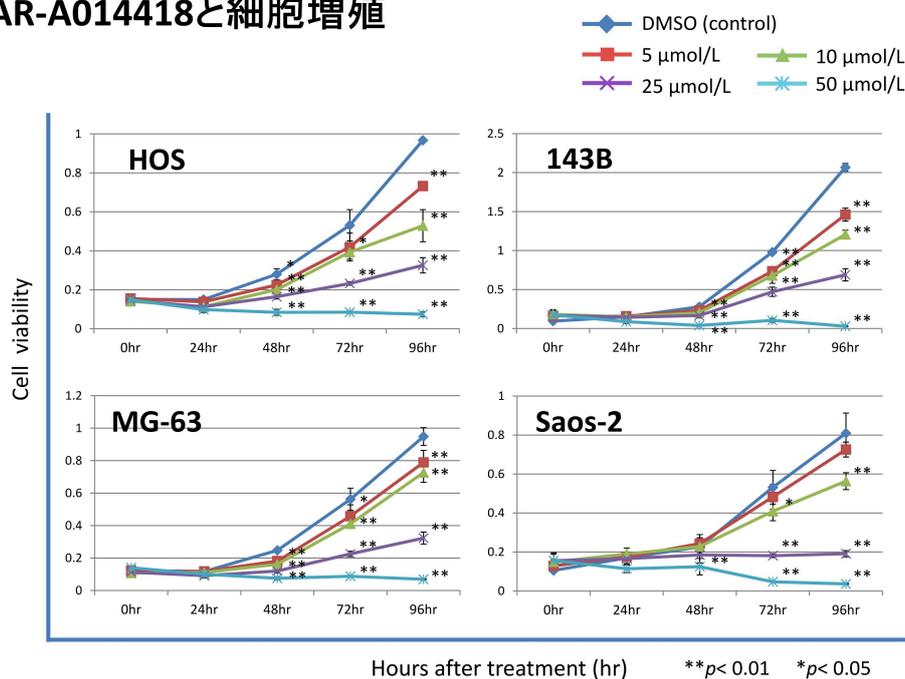


図1. GSK-3 β 阻害薬と細胞増殖 (AR-A014418)

AR-A014418 処理後の細胞増殖。WST-8 で評価した。

SB-216763と細胞増殖

WST-8 assay

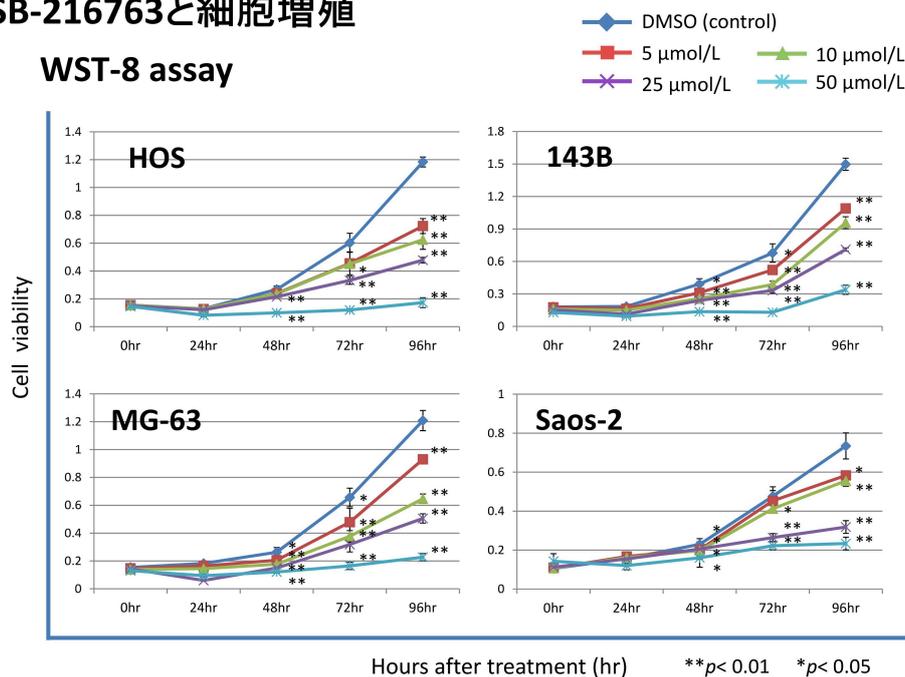


図2. GSK-3β 阻害薬と細胞増殖 (SB-216763)

SB-216763 処理後の細胞増殖。WST-8 で評価した。

一方、骨芽細胞 hFOB1.19 への影響はわずかであった。96 時間の時点での AR-A014418 の IC₅₀ は HOS 細胞で 12.4 μmol/L、143-B 細胞で 11.7 μmol/L、MG-63 細胞で 16.0 μmol/L、SaOS2 細胞で 14.6 μmol/L であった。また、SB-216763 の IC₅₀ は HOS 細胞で 10.5 μmol/L、143-B 細胞で 17.1 μmol/L、MG-63 細胞で 14.3 μmol/L、SaOS2 細胞で 21.9 μmol/L であった。骨肉腫細胞において、GSK-3β 阻害薬は BrdU 陽性の増殖細胞を有意に減少させた。また、骨肉腫細胞において GSK-3β 阻害薬は TUNEL 陽性の細胞を有意に増加させたが、骨芽細胞では有意な増加を認めなかった。

RNA 干渉により GSK-3β 発現を低下させたところ、骨肉腫細胞における細胞増殖は低下し、アポトーシスは増加したが、骨芽細胞における有意な変化は認めなかった。これらの結果から、GSK-3β の発現と活性は骨肉腫細胞における細胞の増殖に関与しており、骨肉腫の治療標的となる可能性が示唆された。

また、Wnt/β-catenin 経路への GSK-3β 阻害薬の作用を見るために骨肉腫細胞における β カテニンの発現を評価し、GSK-3β 阻害薬処理後の β カテニンの変化を観察したところ、骨肉腫細胞において β カテニンのリン酸化を認め、GSK-3β 阻害薬は GSK-3β のリン酸化を抑制した。

Wnt/ β -catenin pathway (Western blotting analysis)

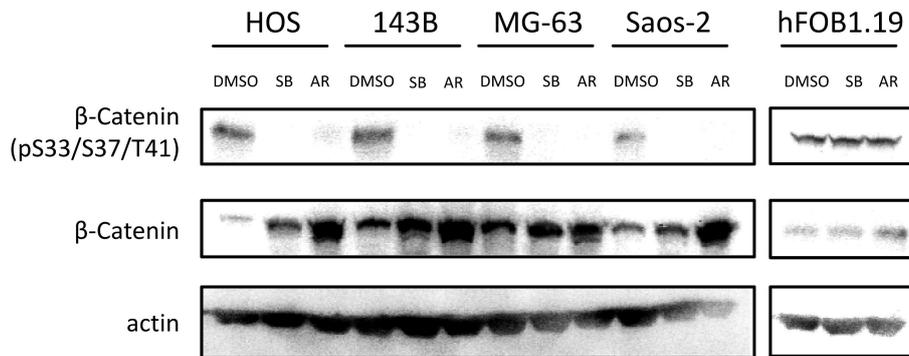


図3. 骨肉腫細胞における Wnt/ β -catenin pathway
Western blotting analysis で評価した。

2. *In vivo* 実験

143-B 細胞を同所性に移植したマウスにおいて、GSK-3 β 阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) の副作用、腫瘍抑制効果を評価した。腫瘍体積の評価において、GSK-3 β 阻害薬は治療開始から2週以降で有意な腫瘍増殖抑制を示し、切除した腫瘍重量においても有意な抑制効果を認めた。

In vivo

Tumor volume (= $0.5 \times a^2 \times b$)

■ DMSO
■ AR-A014418
■ SB-216763

** $p < 0.01$

* $p < 0.05$

Tumor weight

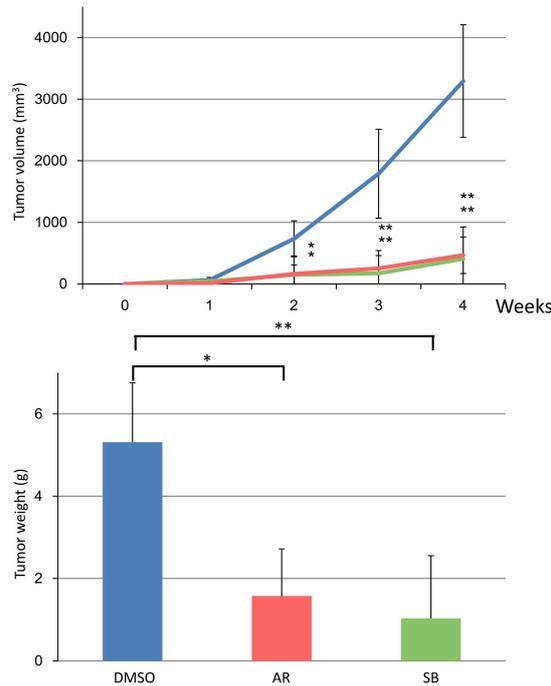


図 4. GSK-3 β 阻害薬による腫瘍抑制効果

骨肉腫モデルマウスにおける GSK-3 β 阻害薬処理後の腫瘍体積と腫瘍重量。

また、マウスの体重評価では、GSK-3 β 阻害薬 (AR-A014418, SB-216763) による明らかな副作用は見られなかった。各群のマウスにおいて肺転移は見られなかった。

考 察

骨肉腫に対する治療は、シスプラチンやアドリアマイシンを代表とする抗がん剤治療と手術療法が標準的だが、抗がん剤に抵抗性の症例や、抗がん剤の強い副作用により投与を中止しなければならない症例も多く、新規治療薬の開発が望まれている。近年、様々ながん種において分子標的治療薬の開発が進み、一部の腫瘍においてその有用性を示しているが、骨肉腫に対する分子標的治療は未だ確立されていない。

GSK-3 β は前立腺癌、大腸癌、膵癌、胃癌、肝細胞癌、卵巣癌など様々な癌種の増殖に関与することが報告されており、GSK-3 β 阻害薬が神経膠芽腫、大腸癌において *in vitro*、*in vivo* ともに抗腫瘍効果をもつと報告されている^{1,2)}。さらに、膵癌でも GSK-3 β 阻害薬がゲムシタピンの作用を増強させることも報告されている³⁾。これまでに GSK-3 β 阻害薬による骨肉腫細胞のアポトーシスや *in vivo* での効果に関する報告はなく、本研究においてはじめて骨肉腫における抗腫瘍効果をもつことを示し、この結果は骨肉腫の新規治療薬としての可能性を示唆するものと考えられる。

GSK-3 β は Wnt/ β -catenin 経路に関与しており、GSK-3 β を阻害することで Wnt/ β -catenin 経路が亢進し、骨新生が促進されると報告されている。⁴⁾ 骨肉腫では腫瘍細胞により骨組織が破壊されるが、GSK-3 β 阻害薬により、破壊された骨において骨新生が亢進すれば骨切除範囲を縮小でき、結果として手術後の良好な患肢機能が期待できると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、金沢大学医学系研究科の土屋弘行および山本憲男である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く申し上げます。

文 献

- 1) Miyashita K, Kawakami K, Nakada M, Mai W, Shakoori A, Fujisawa H, Hayashi Y, Hamada J, Minamoto T. Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3beta inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1;15(3):887-97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0760.
- 2) Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9;334(4):1365-73.
- 3) Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol.* 2012 Mar;47(3):321-33. doi: 10.1007/s00535-011-0484-9.
- 4) Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med (Berl).* 2013 Jan;91(1):15-23. doi: 10.1007/s00109-012-0974-0.